

1/7/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

011685255 **Image available**

WPI Acc No: 1998-102165/199810

Detecting biologically active substances in substance libraries -
introducing receptor to substance library with significantly higher
molecular wt. than ligand to be detected, performing spectroscopic
measurement to detect dipolar resonance phenomena

Patent Assignee: MEYER B (MEYE-I); PETERS T (PETE-I)

Inventor: MEYER B; PETERS T

Number of Countries: 004 Number of Patents: 005

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 19649359	C1	19980212	DE 1049359	A	19961128	199810 B
GB 2321104	A	19980715	GB 9724994	A	19971126	199830
GB 2321104	B	20000726	GB 9724994	A	19971126	200037
CH 690695	A5	20001215	CH 972708	A	19971124	200106
US 6214561	B1	20010410	US 97978344	A	19971125	200122

Priority Applications (No Type Date): DE 1049359 A 19961128

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

DE 19649359	C1	14	G01N-021/25		
-------------	----	----	-------------	--	--

GB 2321104	A		G01N-024/08		
------------	---	--	-------------	--	--

GB 2321104	B		G01N-024/08		
------------	---	--	-------------	--	--

CH 690695	A5		G01N-021/25		
-----------	----	--	-------------	--	--

US 6214561	B1		G01N-033/53		
------------	----	--	-------------	--	--

Abstract (Basic): DE 19649359 C

The method involves introducing a receptor to the substance library
with a significantly higher molecular wt. than the ligand to be
detected.

A spectroscopic measurement process is then performed using the
resulting mixture without isolating the receptor-ligand complex in
order to detect dipolar resonance phenomena which occur when a receptor
binds to a ligand.

ADVANTAGE - Simpler and can be implemented more rapidly than
conventional methods. Does not require immobilizing or marking of
receptors or ligand to be detected.

Dwg. 1/4

Derwent Class: S03

International Patent Class (Main): G01N-021/25; G01N-024/08; G01N-033/53

International Patent Class (Additional): C07K-001/04; G01N-021/64;

G01N-024/00; G01N-024/10; G01N-033/483; G01N-033/543; G01N-033/566;
G01R-033/465



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Pat ntschrift
⑩ DE 196 49 359 C 1

⑤1 Int. Cl.⁶:
G 01 N 21/25
G 01 N 24/08
G 01 N 24/10
G 01 N 21/84
G 01 N 33/483

②1 Aktenzeichen: 196 49 359.5-52
②2 Anmeldetag: 28. 11. 96
④3 Offenlegungstag: —
④5 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 12. 2. 98

DE 196 49 359 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦3 Patentinhaber:

Peters, Thomas, Prof. Dr., 23552 Lübeck, DE; Meyer,
Bernd, Prof. Dr., 22844 Norderstedt, DE

⑦4 Vertreter:

Witte, Weller, Gahlert, Otten & Steil, 70178 Stuttgart

⑦2 Erfinder:

gleich Patentinhaber

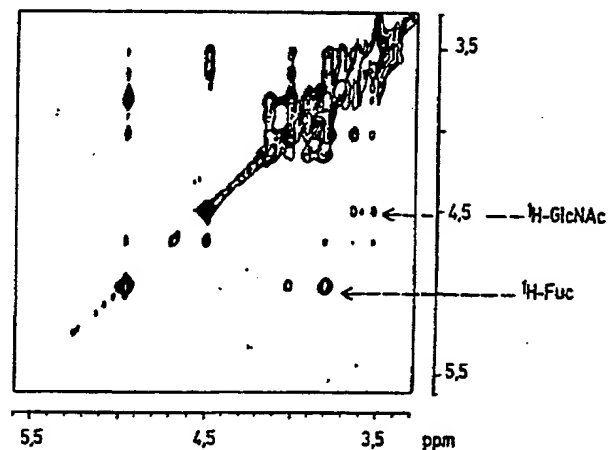
⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

WO 96 22 530 A1
WO 95 25 737 A1

YOUNGQUIST, R.S., et al.: Matrix-assisted Laser
Desorption Ionization for Rapid Determination of the
Sequences of Biologically Active Peptides Isolated
from Support-bound Combinatorial Peptide
Libraries, in: Rapid Communications in Mass
Spectrometry, Vol. 8, 1994, S. 77-81;
US-Z.: OVERHAUSER, A.W.: Paramagnetic
Relaxation in Metals, in: Physical Review, Vol. 89,
No. 4, 1953, S. 689-700;

⑤4 Verfahren zum Nachweis biologisch aktiver Substanzen in Substanzbibliotheken

⑤7 In einem Verfahren zum Nachweis zumindest einer in
einer Substanzbibliothek vorhandenen Substanz (Ligand)
unter Verwendung zumindest einer weiteren, an den Ligan-
den bindenden Substanz (Rezeptor), wird ein solcher Rezep-
tor zu der Substanzbibliothek zugegeben, der ein wesentlich
höheres Molekulargewicht als der nachzuweisende Ligand
aufweist, und dann ein solches spektroskopisches Meßver-
fahren mit der Mischung durchgeführt, ohne Isolierung des
Rezeptor-Liganden-Komplexes, mit dem diejenigen dipola-
ren Resonanzphänomene erfaßbar sind, die bei einer Bin-
dung des Rezeptors an den Liganden auftreten (Fig. 4).



E 196 49 359 C 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft in Verfahren zum Nachweis zumindest einer in einer Substanzbibliothek vorliegenden Substanz (Ligand) unter Verwendung zumindest einer weiteren, an den Liganden bindenden Substanz (Rezeptor).

Solche Verfahren sind aus dem biochemischen Laboralltag bekannt.

Ein Substanz im Sinne der vorliegenden Erfindung kann ein Molekül, ein Aggregat oder Komplex aus mehreren gleichen oder verschiedenen Molekülen und/oder Atomen sein.

Ein Ligand, der an einen Rezeptor bindet, also eine Bindungsaffinität für diesen Rezeptor aufweist, wird als biologisch aktive Substanz bezeichnet.

Unter Substanzbibliotheken, die auch kombinatorische Bibliotheken genannt werden, versteht man synthetische oder natürliche Gemische, in denen mehrere verschiedene Substanzen enthalten sind. Die Menge und die Identität der einzelnen in der Bibliothek enthaltenen Substanzen sind meist nicht bekannt, oft kennt man aber das Herstellungsverfahren, durch das diese Gemische erhalten wurden. Solche Substanzbibliotheken können entweder aus einer Art von Verbindungen bestehen, bspw. aus Peptiden, oder organisch synthetisierten Verbindungen, sie können jedoch auch verschiedene Komponenten umfassen, wie bspw. Pflanzenextrakte. Auch komplexe Bestandteile wie ganze Viren, Bakterien oder Zellen können in einer Substanzbibliothek enthalten sein.

Substanzbibliotheken spielen vor allem in der Arzneimittelforschung eine wesentliche Rolle, wenn es darum geht, als Arzneimittel geeignete Substanzen in komplexen Gemischen nachzuweisen oder in solchen Gemischen neue biologisch aktive Substanzen zu finden.

Solche Untersuchungen werden auch als "Screening" von Substanzbibliotheken bezeichnet. Das Screening, also die Untersuchung, ob eine interessierende Substanz oder eine Substanz mit potentiell interessanten Eigenschaften in einer Substanzbibliothek vorliegt, erfolgt dann mit einem Rezeptor. Der Rezeptor stellt die Angel dar, mit der der Ligand aus der Substanzbibliothek gefischt werden kann.

Zum Screening von Substanzbibliotheken sind die verschiedensten Verfahren entwickelt worden, die sowohl in der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung als auch in der biochemischen und medizinischen Grundlagenforschung eingesetzt werden. Weit verbreitete Verfahren sind bspw. der ELISA-Test, der RIA-Test, die Affinitätschromatographie oder die verschiedenen bekannten Blotmethoden, der Western-, Northern- oder Southern-Blot.

All diesen Verfahren ist es gemeinsam, daß der Ligand in der Substanzbibliothek mit Hilfe des Rezeptors räumlich von den übrigen Substanzen der Bibliothek getrennt wird. Diese räumliche Trennung kann während oder nach der Bindung des Rezeptors an den Liganden erfolgen. Zu dieser räumlichen Trennung ist es notwendig, daß einer der Bindungspartner (also entweder der Rezeptor oder die Komponenten der Substanzbibliothek) an einen festen Träger immobilisiert wird. Solche Träger liegen meist in Form von Mikrotiterplatten, Chromatographieharzen, Kügelchen ("beads") oder Filterpapieren vor.

Um den Rezeptor-Liganden-Komplex nachweisen zu können, ist es häufig außerdem noch notwendig, eines der beteiligten Moleküle zu markieren, sei es radioaktiv oder nicht radioaktiv. Alternativ kann auch ein spezifisches Nachweismittel wie bspw. ein Antikörper dazu verwendet werden, den Rezeptor-Liganden-Komplex zu detektieren.

Bei der zum Screening von Substanzbibliotheken weit verbreiteten Affinitätschromatographie wird bspw. der Rezeptor an ein Chromatographieharz immobilisiert und mit diesem eine Chromatographiesäule hergestellt. Wenn über diese Säule eine Substanzbibliothek gegeben wird, in der ein Ligand für den an die Säule gekoppelten Rezeptor enthalten ist, so bindet dieser spezifisch an den immobilisierten Rezeptor und kann so von den übrigen Substanzen der Bibliothek abgetrennt werden. Der Nachweis des Liganden erfolgt danach z. B. durch Elution des Liganden von der Säule und nachgeschaltete Nachweisreaktionen.

Diese Nachweisreaktionen können darin bestehen, den Liganden mit einem spezifischen Antikörper nachzuweisen, oder, wenn er markiert war, diese Markierung nachzuweisen.

Häufig ist es nicht möglich, die Substanzen einer Bibliothek zu markieren, und häufig hat man auch keine spezifischen Antikörper zum Nachweis in der Hand, vor allem dann nicht, wenn ein neuer Ligand in der Substanzbibliothek identifiziert werden soll.

Dann müssen Verfahren zur chemischen Analyse durchgeführt werden, bspw. Sequenzierungsreaktionen, die derzeit allerdings nur für Nukleinsäuren und Peptide möglich sind.

Eine weitere Möglichkeit der Analyse des über den Rezeptor von der Substanzbibliothek abgetrennten Liganden ist die Massenspektrometrie. Sie wurde in jüngster Zeit in zunehmendem Maße dazu eingesetzt, Substanzbibliotheken zu analysieren.

Ein derartiges Verfahren ist aus der WO 96/22530 A1 bekannt. Hierbei wird ein Rezeptor zur einer Substanzbibliothek gegeben, wobei sich bei Anwesenheit eines Liganden für den Rezeptor in der Substanzbibliothek Liganden-Rezeptor-Komplexe ausbilden, die dann von den übrigen Verbindungen der Substanzbibliothek abgetrennt werden. Die Abtrennung erfolgt meist über chromatographische Methoden. Danach werden die isolierten Rezeptor-Liganden-Komplexe mittels Massenspektrometrie analysiert.

Ein weiteres auf massenspektrometrischen Methoden beruhendes Verfahren zur Identifizierung von in Substanzbibliotheken vorliegenden Verbindungen ist in der WO 95/25737 A1 beschrieben. Hierbei wird die Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS) dazu verwendet, die Molekulargewichte von kleinen Verbindungen in der Substanzbibliothek wie Peptiden, Oligonucleotiden oder Heterocyklen zu bestimmen.

Ein weiteres Beispiel für ein auf Massenspektrometrie beruhendes Verfahren ist in der Publikation "Matrix-assisted laser desorption ionization for a rapid determination of the sequences of biologically active peptides isolated from support-bound combinatorial peptide libraries" von Youngquist et al, 1994, Rapid Communica-

tions in Mass Spectrometry, Nr. 8, Seiten 77—81 beschrieben.

Hier wird eine spezielle massenspektrometrische Technik, die "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization" (MALDI) dazu eingesetzt, aus einer synthetischen Peptidbibliothek solche Peptide zu isolieren, die möglicherweise dazu geeignet sind, Infektionen mit dem HIV-Virus zu inhibieren.

In dem beschriebenen Verfahren wurde eine Peptidbibliothek durch automatische Synthese von Peptiden mit zufälligen Sequenzen an einem festen Träger, der in Form von inerten Plastik-Kügelchen vorliegt, hergestellt. Die auf den Kügelchen immobilisierten Peptide werden auf ihre biologische Aktivität mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers getestet, der gegen ein bestimmtes Oberflächenprotein des HIV-Virus gerichtet ist. Diejenigen Kügelchen, an die der Antikörper gebunden hatte, wurden in einem Enzym-gekoppelten Färbeverfahren nachgewiesen, wie es aus der ELISA- bzw. Immunblot-Technik bekannt ist. Gefärbte Kügelchen wurden isoliert und die daran gebundenen Peptide abgespalten. Diese Peptide wurden in der MALDI analysiert, in der eine direkte Sequenzanalyse und damit Identifizierung der Peptide möglich ist.

Jeder Schritt dieses Verfahrens weist grundlegende Nachteile auf, die auch für die übrigen bekannten Verfahren zum Nachweis spezifischer Liganden in Substanzbibliotheken charakteristisch sind. Alle diese Verfahren beruhen nämlich darauf, den Rezeptor als Komplex mit dem Liganden räumlich von den übrigen Komponenten der Substanzbibliothek zu trennen. Diese räumliche Trennung setzt die Immobilisierung entweder des Liganden, wie in der oben zitierten Veröffentlichung beschrieben, oder des Rezeptors, wie bspw. in der Affinitätschromatographie, an einen festen Träger voraus.

Diese Immobilisierung stellt ein wesentliches Problem bei solchen Analyseverfahren dar, da biologisch aktive Rezeptoren häufig durch die Immobilisierung inaktiviert werden. Die Bindungsstellen für Liganden auf Rezeptoren liegen im allgemeinen an der Oberfläche der Moleküle. Dadurch sind diese Bindungsstellen dann auch dazu geeignet, direkt an der Immobilisierungsreaktion teilzunehmen, bei der nicht kontrolliert werden kann, welche Stelle des Rezeptors dazu benutzt wird. So kommt es häufig vor, daß an dem Rezeptor gerade die Bindungsstelle für den Liganden direkt an den Träger gekoppelt und damit für den später zugegebenen Liganden nicht mehr zugänglich ist.

Ein weiteres Problem bei der Immobilisierung vor allem von Proteinrezeptoren stellt die Denaturierung dar, also eine Konformationsänderung des Rezeptors, durch die die Bindungsaktivität ebenfalls verlorengeht.

Werden die Substanzen der Bibliothek immobilisiert, so ist nicht vorauszusehen, ob alle Substanzen gleich gut immobilisiert werden können, und welche Substanzen danach noch biologisch aktiv sind. Dies birgt die Gefahr, daß biologisch aktive Substanzen zwar in der untersuchten Bibliothek vorhanden sind, sie jedoch nicht immobilisiert und damit dem Verfahren zugänglich gemacht werden konnten. Dann fällt die Nachweisreaktion negativ aus, obwohl ein Ligand in der Substanzbibliothek enthalten war.

Ein weiterer gravierender Nachteil der bekannten Verfahren ist ihre komplizierte und langwierige Durchführung. Nach der Immobilisierung des Liganden oder Rezeptors sind viele Waschschriffe notwendig, um nicht immobilisierte Moleküle zu entfernen, erst dann kann mit dem Rezeptor oder der Substanzbibliothek inkubiert werden. Nach der Inkubation sind wiederum Waschschriffe notwendig, um ungebundenes Material zu entfernen, und danach schließen sich noch komplizierte Analyseverfahren wie Immunfärbungen oder, nach Abspaltung des zu analysierenden Materials vom Träger, massenspektrometrische Analysen an.

Das Durchführen von Immunfärbungen setzt voraus, spezifische Antikörper gegen den Liganden in der Hand zu haben. Dies ist dann unmöglich, wenn neue Liganden gesucht werden, und sehr schwierig, wenn Liganden untersucht werden sollen, die keine Proteine sind.

Eine Alternative zur Immunfärbung ist das radioaktive oder nicht radioaktive Markieren der Substanz in der Bibliothek. Dies ist lediglich bei der Untersuchung von Nukleinsäurebibliotheken kein Problem, für alle übrigen Verbindungen sind entweder keine Markierungstechniken bekannt, oder sie weisen weitere erhebliche Nachteile auf. Zum Beispiel stellt das radioaktive Markieren von Proteinen durch "Jodierung" ein erhebliches Gesundheitsrisiko dar.

Ein weiterer Nachteil liegt darin begründet, daß in einer Substanzbibliothek mehrere Substanzen mit gleicher oder ähnlicher Affinität für den Rezeptor vorliegen können. Sie werden dann als Gemisch isoliert und können mit den bekannten Methoden nicht analysiert werden.

Ein weiterer Nachteil der bekannten Verfahren liegt darin, daß es nicht möglich ist, die Konformation, also die 3D-Struktur, des gebundenen Liganden oder des Rezeptor-Liganden-Komplexes zu analysieren.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zum Nachweis einer in einer Substanzbibliothek vorhandenen Substanz bereit zu stellen, das wesentlich einfacher und schneller durchzuführen ist als die bekannten Verfahren, und in dem eine Immobilisierung oder Markierung des Rezeptors oder des Liganden sowie eine räumliche Trennung des Rezeptor-Liganden-Komplexes von den übrigen Substanzen der Substanzbibliothek nicht mehr notwendig ist.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe bei einem Verfahren der eingangs genannten Art durch die folgenden Verfahrensschritte gelöst:

- a) Zugabe eines solchen Rezeptors zu der Substanzbibliothek, der in wesentlich höheres Molekulargewicht als der nachzuweisende Ligand aufweist, und
- b) Durchführen eines solchen spektroskopischen Meßverfahrens mit der aus Schritt a) resultierenden Mischung, ohne Isolierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes, mit dem diejenigen dipolaren Resonanzphänomene erfaßbar sind, die bei einer Bindung des Rezeptors an den Liganden auftreten.

Die Erfinder haben erkannt, daß es möglich ist, einen Liganden direkt in einer Substanzbibliothek nachzuweisen, indem man mit an sich bekannten spektroskopischen Meßverfahren diejenigen dipolaren Resonanzphänomene erfaßt werden, die dann und nur dann stattfinden, wenn ein Rezeptor mit einem wesentlich höheren Molekular-

gewicht als der nachzuweisende Ligand an den Liganden bindet.

Dipolare Resonanzphänomene beruhen auf der Resonanzwechselwirkung zwischen den in eine Probe eingestrahlten elektromagnetischen Wellen mit Dipolen. Die dipolaren Wechselwirkungen sind abhängig von der Beweglichkeit desjenigen Moleküls, in dem die Dipole enthalten sind. Die Molekülbeweglichkeit ist wiederum davon abhängig, ob das Molekül frei in Lösung vorliegt oder ob es mit einem großen Molekül assoziiert ist, also bspw. als Komplex vorliegt. Wenn ein kleiner Ligand an einen großen Rezeptor bindet, so wird die Molekülbeweglichkeit durch den großen Rezeptor bestimmt. Nur aktive Substanzen sind überhaupt fähig, eine Bindung mit dem Rezeptor einzugehen. Die Tatsache, daß überhaupt eine Bindung stattgefunden hat, wird dadurch nachweisbar, daß der Rezeptor mit dem wesentlich höheren Molekulargewicht als der Ligand den Komplex aus Ligand und Rezeptor charakteristisch prägt.

Es hat sich nun überraschenderweise herausgestellt, daß dieses Phänomen dazu eingesetzt werden kann, die Bindung eines Rezeptors an einen Liganden auch dann nachzuweisen, wenn eine Vielzahl weiterer Substanzen direkt in der untersuchten Lösung enthalten ist. Bei Zugabe des Rezeptors zu der Substanzbibliothek treten dann, wenn der Rezeptor an den Liganden bindet, ganz spezifische Meßsignale auf, die von den übrigen Meßsignalen diskriminiert werden können. Findet keine Bindung statt, so treten diese spezifischen Meßsignale nicht auf, d. h. in der Substanzbibliothek ist kein Ligand für den Rezeptor enthalten.

Bei diesem Verfahren ist es nunmehr nicht mehr nötig, den Rezeptor oder den Liganden zu immobilisieren oder in irgendeiner Weise zu modifizieren oder markieren. Dadurch fallen nicht nur aufwendige Verfahrensschritte weg, sondern es besteht auch keine Gefahr der biologischen Inaktivierung durch diese Verfahrensschritte mehr.

Der spektroskopische Nachweis der Rezeptor-Liganden-Interaktion in der Substanzbibliothek erfolgt direkt nach Zugabe des Rezeptors frei in Lösung, so daß die natürliche (native) Konformation aller beteiligten Moleküle erhalten bleibt. Dadurch wird gewährleistet, daß die in vivo exponierten Bindungsstellen zugänglich und erhalten sind. Die Rezeptor-Liganden-Interaktion kann somit unbeeinflusst von experimentellen Einflüssen stattfinden.

Die Bindungsreaktion kann sogar dann nachgewiesen werden, wenn zusätzliche Moleküle zu dieser Bindung benötigt werden, wenn diese ebenfalls in der Substanzbibliothek enthalten sind. Dies ist bspw. bei allosterischen Enzymreaktionen wichtig, in denen die Bindung des Enzyms an sein Substrat durch dritte Moleküle, sogenannte allosterische Effektoren beeinflusst wird.

Ein erheblicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß eine Isolierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes, also eine räumliche Trennung dieses Komplexes von den übrigen Substanzen der Bibliothek, nicht mehr notwendig ist. Dadurch, daß dieser zeitaufwendige, bei jedem individuellen Experiment neu zu optimierende Verfahrensschritt wegfällt, verkürzt und vereinfacht sich das Verfahren erheblich. Darüber hinaus werden die mit dem Trennverfahren verbundenen Verluste vermieden.

So kann mit einem Minimum an experimentellen Vorbereitungen und mit einer spektroskopischen Standardausrüstung schnell herausgefunden werden, ob ein interessierender Ligand in einer Substanzbibliothek enthalten ist. Dieses Verfahren ist also bestens dazu geeignet, ein "Screening" von Substanzbibliotheken vorzunehmen.

Sucht man in einer Substanzbibliothek eine an sich bekannte Substanz, die sich als solche spektroskopisch von den anderen Substanzen nicht unterscheiden läßt, so ist dies nunmehr nach der Bindung dieser nachgesuchten Substanz (Ligand) an den Rezeptor deswegen möglich, da die spektroskopisch erfaßbaren Eigenschaften nunmehr durch den Rezeptor charakteristisch beeinflusst werden.

Diese Eigenschaften liegen spektral anders als die der Substanzbibliothek als solcher und auch anders als die des ungebundenen Rezeptors. Somit können in diesem Fall routinemäßig, nach Zugabe des Rezeptors, Substanzbibliotheken nach dem Vorhandensein der nachgesuchten Substanz abgefragt werden.

Es ist auch möglich, Substanzbibliotheken danach abzufragen, ob überhaupt eine aktive Substanz enthalten ist, denn nur diese wird an den Rezeptor binden. Die durch diese Bindung erstmals auftretenden dipolaren Resonanzphänomene erscheinen im Spektrum und können, ggf. unter Heranziehung mehrerer Meßmethoden, über die diese dipolaren Resonanzphänomene erfaßt werden können, einer bestimmten Substanz (Ligand) zugeordnet werden.

Somit wird die erfindungsgemäße Aufgabe vollkommen gelöst.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als spektroskopisches Meßverfahren die NMR (Nuclear Magnetic Resonance)-Spektroskopie eingesetzt.

Hierbei ist vorteilhaft, daß diese bereits seit Jahren bekannte Technik sich inzwischen zu einer Routinetechnik entwickelt hat. So stehen vielerorts Standard-NMR-Spektrometer bereit, mit deren Hilfe das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden kann. Am häufigsten wird mit Hilfe der NMR die Protonenresonanz von ^1H bestimmt, das vor allem bei biologisch aktiven Molekülen in großer Zahl enthalten ist und ein großes magnetisches Moment aufweist. Durch die Bindung an den Rezeptor treten Resonanzphänomene auf, die charakteristisch sind. Dadurch ist es möglich, praktisch alle biologisch interessanten Moleküle mit einer gut etablierten Technik dem erfindungsgemäßen Verfahren zugänglich zu machen.

In einer besonders bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als dipolares Resonanzphänomen der Transfer-Kern-Overhauser-Effekt (trNOE, transfer Nuclear Overhauser Effect) gemessen.

Diese Ausgestaltung beruht auf dem Kern-Overhauser-Effekt oder Nuklear-Overhauser-Effekt (NOE; er wurde als generell zuerst erstmals beschrieben in "Paramagnetic Relaxation in Metals", 1953, Physical Review 89, Seiten 689—700). Durch den NOE werden die in einem NMR-Experiment gemessenen Signale verstärkt. Der Kern-Overhauser-Effekt beruht auf der dipolaren Wechselwirkung von Kernspins, z. B. von ^1H -Kernen, durch den Raum. Der Verstärkungseffekt, der durch den NOE zustandekommt, hängt vom Abstand der über Dipol-Dipol-Wechselwirkung verknüpften Kerne und von der Zeit ab. Die dipolaren Kopplungen zwischen Wasserstoffkernen hängen von der molekularen Beweglichkeit ab, diese Kopplungen sind bei niedermolekularen Substanzen

zen völlig anders als bei hochmolekularen Substanzen. Wenn nun ein Ligand an einen Rezeptor bindet, der ein wesentlich höheres Molekulargewicht als der Ligand aufweist, so zeigt der Ligand ein n sogenannten Transfer-NOE, denn seine Molekülbeweglichkeit wird nun durch den höhermolekularen Rezeptor bestimmt (trNOE, beschrieben in "Negative Nuclear Overhauser Effects as Probes of Macromolecular Structure", 1972, Journal of the American Chemical Society 94, Seiten 4015–4017). Anders ausgedrückt, transferiert der Rezeptor spezifische, spektroskopisch nachweisbare Eigenschaften auf den Liganden, die einerseits die Tatsache der Bindung als solche anzeigen und andererseits anzeigen, mit welcher Substanz (Ligand) der Rezeptor gebunden hat.

Beim Messen des trNOE ist von Vorteil, daß damit mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität zwischen den an den Rezeptor gebundenen und den nicht gebundenen Substanzen in der Substanzbibliothek unterschieden werden kann, und zwar auch dann, wenn die Substanzbibliothek ein komplexes Gemisch aus verschiedensten Komponenten umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführung wird als dipolares Resonanzphänomen der Transfer-Elektron-Kern-Overhauser-Effekt gemessen.

Hierbei wird der Austausch von dipolarer Polarisierung zwischen Elektronen und Atomkernen mit magnetischem Moment gemessen. Dieser Effekt tritt bspw. auf, wenn radikalische Liganden oder Rezeptoren vorliegen und es zu einer Bindungsreaktion kommt.

Man beobachtet hierbei eine starke Änderung der Signalintensität, die dann Aufschluß über Natur des gebundenen Zustands erlaubt.

Hierbei ist von Vorteil, daß starke Änderungen in der Signalintensität beobachtet werden können, die dann Aufschluß über die Natur des gebundenen Zustands geben.

Im folgenden werden der Transfer-Kern-Overhauser-Effekt und der Transfer-Elektron-Kern-Overhauser-Effekt unter der Abkürzung trNOE zusammengefaßt.

In einer besonders bevorzugten Ausführung wird der trNOE in einem zweidimensionalen NOE-Spektroskopie-Experiment (2D-NOESY oder 2D-ROESY) gemessen.

Das 2D-NOESY bzw. 2D-ROESY ist ein Experiment, in dem ein zweidimensionales NMR-Spektrum aufgezeichnet wird, also ein Spektrum, das zwei Frequenzachsen hat. Die Intensitäten der dabei entstehenden Signale, der sogenannten "Crosspeaks" entsprechen der dritten Dimension.

Ein Zweidimensionales NMR-Experiment besteht aus mehreren Phasen, der ersten sogenannten Präparationsphase, einer zweiten sogenannten Evolutions und Mischphase und der eigentlichen Detektionsphase, in der ein Inferogramm (FID) aufgezeichnet wird. Die Zeit der Evolutionsphase, t_1 genannt, ist eine variable Wartezeit, die im Bereich von Millisekunden bis Sekunden liegt, und innerhalb derer sich chemische Verschiebungen und Spin-Spin-Kopplungen entwickeln. Die Mischphase folgt dabei auf die Evolutionsphase oder unterbricht sie auch. Während der Mischphase entwickeln sich die dipolaren Resonanzphänomene, wobei die Mischzeit jedoch konstant ist, während die Evolutionszeit t_1 innerhalb eines Experiments verändert wird. Nach der Evolutions- und Mischphase erfolgt die Detektionsphase mit einer Zeit t_2 , die ebenfalls konstant ist. Die in einem zweidimensionalen NMR-Experiment aufgezeichneten Daten werden oft im sogenannten Konturdiagramm dargestellt. Ein solches Konturdiagramm zeigt einen Schnitt entlang einer Höhenlinie durch das entstehende "Signalgebirge", also durch die Crosspeaks des Spektrums.

Das Messen des trNOE in ^2D -NOESY-Experimenten hat den Vorteil, eine große spektrale Auflösung zu gewährleisten, also eine große Trennung oder Spreizung der Signale zu erreichen. Damit ist es möglich, vor allem in komplex aufgebauten Substanzbibliotheken trNOEs spezifisch und bei niedrigen Konzentrationen der nachzuweisenden Liganden zu detektieren.

Diese zweidimensionalen Experimente können auch als Bestandteil mehrdimensionaler Experimente durchgeführt werden.

Es versteht sich, daß beliebig viele Evolutionszeiten konstant gehalten werden können und sich so die Dimensionalität reduzieren läßt.

In einer bevorzugten Ausgestaltung wird der trNOE als Bestandteil eines mehrdimensionalen homo- oder heteronuklearen Experiments gemessen.

Ein solches Experiment kann bspw. ein 3D-HMQC-NOESY, ein 3D-NOESY-NOESY, oder ein 4D-TOCSY-NOESY-HSQC sein (HMQC = Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, TOCSY = Totally Correlated Spectroscopy, HSQC = Heteronuclear Single Quantum Coherence).

Bei derartigen mehrdimensionalen Experimenten ist vorteilhaft, daß die spektrale Auflösung weiter gesteigert wird.

Es versteht sich, daß alle genannten NMR-Experimente auch in einem rotierenden Koordinatensystem durchgeführt werden können. Dabei wird der trNOE dann als trROE bezeichnet.

Ferner können Techniken herangezogen werden, um die Dimensionalität des Experiments zu erniedrigen oder um gezielte Effekte zu erzielen, wozu eine oder mehrere Evolutionszeiten konstant gehalten werden oder ein oder mehrere Hochfrequenzpulse selektiv oder bereichsselektiv eingestrahlt werden.

Hierbei ist vorteilhaft, daß die Auflösung verbessert wird, z. B. dadurch, daß mehr Datenpunkte erhalten werden, daß die Meßzeit und damit die Dauer der Durchführung des einzelnen Experiments sich verkürzt und der Hintergrund erniedrigt wird. Wird der trNOE in einem eindimensionalen Experiment gemessen, so ist von Vorteil, daß die Auswertung der Spektren besonders einfach ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung wird das 2D-NOESY-Spektrum der Substanzbibliothek in Gegenwart des Rezeptors mit einer kurzen Mischzeit, die insbesondere kleiner als etwa 500 ms ist, durchgeführt.

Hierbei ist von Vorteil, daß sich ein besonders gutes Signal: Hintergrund-Verhältnis ergibt, daß das "Rauschen" also möglichst klein gehalten wird. Durch diese Maßnahme treten die für den gebundenen Liganden charakteristischen Crosspeaks noch deutlicher hervor, wodurch der Nachweis zusätzlich erleichtert wird.

In einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als spektroskopisches Meßverfahren

ren die Fluoreszenz-Spektroskopie eingesetzt.

Dies ist zweckmäßig, wenn die zu untersuchenden Substanzen Fluoreszenz zeigen, d. h. innerhalb von extrem kurzen Zeiträumen nach ihrer Anregung durch Einwirkung von Licht oder sonstiger Strahlung die absorbierte Energie in Form von Strahlung wieder abgeben. Bei der Fluoreszenz-Spektroskopie ist von Vorteil, daß sie sehr empfindlich ist, vor allem dann, wenn eine Laserinduzierte Fluoreszenz nachgewiesen wird. Auch hier beeinflusst der gebundene Rezeptor das Fluoreszenzspektrum charakteristisch.

In einer weiteren Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als spektroskopisches Meßverfahren die ESR (Elektronenspinresonanz)-Spektroskopie eingesetzt.

Die ESR-Spektroskopie wird auch EPR-Spektroskopie genannt (Elektronenparamagnetische Resonanz). Sie beruht darauf, daß bei Einstrahlung einer elektromagnetischen Welle einer bestimmten Frequenz magnetische Resonanzabsorption eintritt, deren Größe gemessen wird. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß es eines der am weitesten verbreiteten spektroskopischen Methoden ist.

In bevorzugten Ausführungen des Verfahrens ist der Ligand eine niedermolekulare Substanz, deren Molekulargewicht insbesondere kleiner als etwa 2000 Da ist, und der Rezeptor ist eine hochmolekulare Substanz, deren Molekulargewicht insbesondere größer als etwa 15000 Da ist.

Bei diesen Maßnahmen ist besonders vorteilhaft, daß sich ausgeprägte trNOEs nachweisen lassen, da bei einem großen Verhältnis des Molekulargewichts des Rezeptors zum Molekulargewicht des Liganden der NOE des Liganden vollkommen von dem NOE des Rezeptors bestimmt wird. Es ergeben sich dann besonders charakteristische Spektren, aus denen das Vorliegen einer Bindung leicht abgelesen werden kann.

Hierbei ist weiterhin von Vorteil, daß pharmazeutisch bedeutsame Substanzen, insbesondere sogenannte Leitsubstanzen, meist ein niedriges Molekulargewicht ($MW < 1000$ bis 2000) aufweisen, bspw. Hormone, Antibiotika, Enzyminhibitoren etc. Ihre Rezeptoren, in den meisten Fällen Proteine, haben dagegen hohe Molekulargewichte, die meist wesentlich größer als 15000 Da sind.

Der Rezeptor kann auch aus mehreren hochmolekularen Substanzen bestehen, kann in ein höhermolekulares Aggregat eingelagert sein oder kann in ganzen Zellen oder in Zellfragmente eingebettet sein.

Es ist außerdem möglich, Kontrollexperimente zu den einzelnen Spektroskopie-Versuchen durchzuführen. Dabei können bspw. Inhibitoren der Rezeptor-Liganden-Bindung eingesetzt werden. Der entsprechende trNOE darf dann unter Zugabe des Inhibitors nicht mehr nachweisbar sein.

Auf diese Weise ist es auch möglich, die Spezifitäten der Rezeptor-Liganden-Bindung auszutesten. Dies ist vor allem dann vorteilhaft, wenn in der Substanzbibliothek mehrere Liganden mit Bindungsaffinitäten für den Rezeptor enthalten sind.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt die Substanzbibliothek natürliche Substanzen, die insbesondere ausgewählt sind aus den Peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, Lipiden, ganzen Zellen, Organellen, Zellextrakten, ganzen Bakterien, Bakterienextrakten, ganzen Viren, Virenextrakten oder Körperflüssigkeiten oder Mischungen davon.

Hierbei ist von Vorteil, daß komplexe Substanzbibliotheken wie Naturstoffgemische oder Gewebsextrakte als solche direkt in das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzt werden können, ohne daß eine vorherige Trennung ihrer Komponenten oder Isolierung einzelner Komponenten notwendig ist. Dadurch wird das Verfahren einfacher und schneller in der Durchführung.

In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung umfaßt die Substanzbibliothek chemisch synthetisierte Substanzen. Diese können Peptide, Oligonukleotide oder sonstige organisch synthetisierte Moleküle sein, es muß wiederum kein einheitliches Gemisch vorliegen.

In der Arzneimittelforschung werden häufig bereits bekannte Wirkstoffe chemisch modifiziert, wobei danach kontrolliert werden muß, ob die modifizierte Form noch biologisch aktiv ist. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es nun möglich, ganze Gemische verschiedener modifizierter Formen in einem Experiment auf ihre biologische Wirksamkeit zu testen. Es muß weder eine vorgeschaltete Trennung z. B. verschieden großer Syntheseprodukte vorliegen, noch müssen die Wirkstoffe chemisch homogen sein. Hierbei ist außerdem auch an Peptidbibliotheken zu denken, die zur Inhibition körpereigener Rezeptoren oder zur Inhibition von Viren oder anderen Krankheitserregern eingesetzt werden können. Hier spielt jeweils die Interaktion zwischen einem niedermolekularen Liganden und einem hochmolekularen Rezeptor eine Rolle, die im erfindungsgemäßen Verfahren schnell getestet werden kann.

Es versteht sich, daß in das erfindungsgemäße Verfahren auch Gemische natürlicher und synthetischer Substanzen als Substanzbibliotheken eingesetzt werden können.

In einer weiteren Ausgestaltung des Verfahrens werden noch nicht bekannte Liganden mit Hilfe weiterer ein- oder mehrdimensionaler NMR-Experimente identifiziert.

Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, in Substanzbibliotheken nach neuen Liganden für bereits bekannte Rezeptoren zu suchen. In einem solchen Verfahren wird ein 2D-NOESY- oder im Regelfall 2D-ROESY-Experiment durchgeführt, und anhand der damit gewonnenen Daten (Spektren, Crosspeaks) werden weitere zwei- oder mehrdimensionale NMR-Experimente durchgeführt, wie bspw. sogenannte COSY-, TOCSY- oder HMQC-Experimente. Diese dem Fachmann bekannten NMR-Verfahren können außerdem als 3D-NMR-Experimente realisiert werden oder vorzugsweise als 1D- oder 2D-Varianten der 3D-Experimente.

Die gleichen Maßnahmen machen es darüber hinaus möglich, nicht nur neue Liganden zu identifizieren, sondern auch die Strukturen bereits bekannter oder noch nicht bekannter Liganden im an den Rezeptor gebundenen Zustand aufzuklären.

Ein solcher Ansatz zur Strukturaufklärung hat den Vorteil, daß die biologisch aktive Konformation eines Liganden, nämlich die an den Rezeptor gebundene Struktur, aufgeklärt werden kann, ohne daß der Ligand vorher zu kristallisieren oder auf sonstige Weise chemisch zu behandeln oder zu beeinträchtigen. Zudem ist dieses Verfahren wesentlich sensibler und kommt mit geringeren Substanzmengen aus als die Standardverfahren zur

Strukturbestimmung.

In einer bevorzugten Ausführung des Verfahrens werden neuronale Netze eingesetzt.

Unter neuronalen Netzen versteht man Programme, deren Struktur und Funktion sich an den Nervennetzen lebender Organismen orientiert. Solche Programme weisen eine erheblich höhere Leistungsfähigkeit auf, besonders bei komplexen Problemstellungen wie Mustererkennung und Lernfähigkeit.

Insbesondere sind hier die Eigenschaften von neuronalen Netzwerken von Vorteil, mit denen Informationen selbst aus Spektren erhalten werden können, die über einen extrem starken Hintergrund verfügen. Dieser Hintergrund kann die Signale in etwa um bis das Zehnfache übersteigen. Ebenso verfügt eine Spektrenerkennung mit neuronalen Netzwerken über die Fähigkeit, aus den Spektren von Gemischen die einzelnen Komponenten zu erkennen. Diese Eigenschaft ist von besonderem Vorteil, wenn bei der Bindung von Liganden an Rezeptoren viele Moleküle ungefähr gleich stark gebunden werden.

Hierbei ist weiter von Vorteil, daß die Empfindlichkeit des Verfahrens sowohl während der Messung als auch während der Auswertung der Meßergebnisse erheblich gesteigert werden kann. Gerade bei der Auswertung komplexer zweidimensionaler Spektren ist es vorteilhaft, leistungsfähige Rechnerprogramme zur Verfügung zu haben, um die wesentlichen Crosspeaks eines Experimentes herauszufiltern.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in der jeweils angegebenen Kombination, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand eines ausgewählten Ausführungsbeispiels unter Verwendung der Zeichnung näher erläutert und beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1 die chemische Formel eines niedermolekularen Disaccharids (Ligand), nämlich α -L-Fuc-(1 \rightarrow 6)- β -D-GlcNAc-OMe, das von dem Lectin *Aleuria aurantia* Agglutinin (Rezeptor AAA) gebunden wird;

Fig. 2a ein 2D-NOESY-Spektrum eines Gemisches aus sechs verschiedenen Sacchariden, in dem das Disaccharid von Fig. 1 enthalten ist (Substanzbibliothek A);

Fig. 2b ein 2D-NOESY-Spektrum eines Gemisches aus 15 verschiedenen Sacchariden, in dem das Disaccharid von Fig. 1 enthalten ist (Substanzbibliothek B);

Fig. 3a ein 2D-trNOESY-Spektrum des Gemisches von Fig. 2a nach Zugabe des Rezeptors AAA;

Fig. 3b ein 2D-trNOESY-Spektrum des Gemisches von Fig. 2b nach Zugabe des Rezeptors AAA; und

Fig. 4 ein 2D-trNOESY-Spektrum des Disaccharids von Fig. 1 in Gegenwart des Rezeptors AAA.

Screening zweier Disaccharid-Substanzbibliotheken mit Hilfe eines Lectins (Rezeptor) durch trNOE

Es wird ein spezielles Disaccharid 1 (Ligand), das in zwei Substanzbibliotheken verschiedener Komplexitäten vorliegt, mit Hilfe eines Proteinrezeptors, nämlich eines Lectins, mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nachgewiesen.

Das Disaccharid 1, α -L-Fuc(1 \rightarrow 6)- β -D-GlcNAc-OMe, ist aus einem Fucoserest und einem substituierten Glucosaminrest zusammengesetzt.

Das in Fig. 1 gezeigte Disaccharid 1 ist in zwei unterschiedliche Substanzbibliotheken A und B, die aus 6 bzw. 15 verschiedenen Kohlenhydratderivaten bestanden, enthalten. Die Zusammensetzung der Disaccharidbibliotheken ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Zusammensetzung der Substanzbibliotheken

Oligosaccharid	Bibliothek A (Konzentration in mmol)	Bibliothek B (Konzentration in mmol)
α -D-Man-OMe	$1,9 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-2}$
α -D-Glc-OMe	$1,9 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-2}$
β -D-Gal-OMe	$1,7 \times 10^{-2}$	$1,7 \times 10^{-2}$
β -D-Gal- (1 \rightarrow 4) - β - D-Glc-OMe	$0,7 \times 10^{-2}$	$1,6 \times 10^{-2}$
Saccharose	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$
α -L-Fuc- (1 \rightarrow 6) - β - D-GlcNac-OMe (Disaccharid 1)	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-2}$
D-Mannitol	-	$1,6 \times 10^{-2}$
D-Raffinose	-	$0,9 \times 10^{-2}$
D-Lactitol	-	$0,9 \times 10^{-2}$
D-Maltitol	-	$0,9 \times 10^{-2}$
α -D-Gal-OMe	-	$1,5 \times 10^{-2}$
β -D-Gal- (1 \rightarrow 4) - β - D-Glc-OAll	-	$0,8 \times 10^{-2}$
β -D-Glc- (1 \rightarrow 4) - β - D-Glc-OBzl	-	$0,8 \times 10^{-2}$
α -D-Man- (1 \rightarrow 2) - α - D-Man-OMe	-	$1,0 \times 10^{-2}$
β -D-Gal- (1 \rightarrow 2) - β - D-Gal-OMe	-	$1,0 \times 10^{-2}$

Es ist bekannt, daß das Lectin Aleuria aurantia Agglutinin (AAA) an das Disaccharid 1 bindet. Von den anderen in den Substanzbibliotheken enthaltenen Kohlenhydratstrukturen war nicht bekannt, ob sie Bindungsaktivität für das Lectin besitzen.

Folgende Versuchsbedingungen wurden gewählt:
Die NMR-Spektren der Substanzbibliotheken A und B wurden auf einem Bruker DRX 500 Spektrometer mit einer Spektrometerfrequenz von 500,13 MHz und bei einer Temperatur von 310 K gemessen. Zur Vorbereitung der Meßproben wurden die Bibliotheken A und B in jeweils 80 μ l D₂O aufgelöst. Je 40 μ l der beiden Lösungen mit den Bibliotheken A und B wurden dann in 500 μ l D₂O verdünnt. Diese Proben wurden für NMR-Experimente verwendet, bei denen kein Rezeptor (Lectin, AAA) eingesetzt wurde.

Die übrigen 40 μ l wurden mit je 500 μ l einer 0,5 mM-Lösung des Lectins (Rezeptor AAA) in D₂O versetzt. Diese Proben wurden für die Messung von trNOEs eingesetzt.

Die Konzentration der Oligosaccharidliganden war in allen Proben ca. 10 mM für jede Komponente, was zu einem molaren Liganden-Rezeptor-Verhältnis von ca. 20 : 1 führte.

Phasensensitive 2D-NOESY-Spektren wurden mit der folgenden Standardpulssequenz aufgenommen, nämlich:

$\pi/2 - t_1 - \pi/2 - \text{Mischzeit} - \pi/2 - t_2$.

t_1 entspricht dabei der Evolutionszeit, t_2 der Detektionszeit, wie bereits zuvor erläutert. Das HDO-Signal (d. h. das Hintergrund-Restsignal von Wasser) wurde mit geringer Leistung vorgesättigt. Die NOESY-Spektren für

die Bibliotheken A und B in Abwesenheit des Lectins wurden mit 512 Inkrementen in t_1 und mit 2K (Bibliothek A) bzw. 4K (Bibliothek B) Datenpunkten in t_2 aufgenommen. Es wurden jeweils 32 Scans aufgenommen. Nach Zero-Filling und Fourier-Transformation wurden $4K \times 2K$ Datenmatrizen erhalten. Die Relaxationsdelays waren 4,4 s (Bibliothek A) bzw. 3,6 s (Bibliothek B). Die Mischzeiten betrugen in beiden Fällen 900 ms. Die spektralen Weiten waren 2740 Hz (Bibliothek A) und 4.496 Hz (Bibliothek B).

Für die trNOESY-Spektren der beiden Bibliotheken in Gegenwart des Lectins wurden 640 Inkremente in t_1 und 4K Datenpunkte mit jeweils 32 Transienten in t_2 aufgenommen. Zero-Filling und Fourier-Transformation ergab $4K \times 2K$ Spektren. Nach dem ersten $\pi/2$ -Puls wurde ein Spinlockfeld von ca. 3,5 KHz angeschaltet, um den störenden Signalhintergrund von Proteinsignalen zu unterdrücken. Die Mischzeit betrug 400 ms und die spektralen Weiten waren 2379 Hz für beide Spektren.

Fig. 2 zeigt die erhaltenen 2D-NOESY-Spektren der Bibliotheken A (Fig. 2a) und B (Fig. 2b) in Abwesenheit des Lectins, also des Rezeptors. Diese 1H -NMR-Spektren weisen starke Überlappungen aller Signale auf. Das NOE-Muster des gesuchten Disaccharids kann nicht erkannt werden.

Fig. 3 zeigt die 2D-trNOESY-Spektren der Substanzbibliotheken A (Fig. 3a) und B (Fig. 3b) in Gegenwart des Lectins. Das NOE-Muster des gesuchten Disaccharids ist jetzt deutlich sichtbar (vgl. auch Fig. 4), denn die für das Disaccharid charakteristischen Crosspeaks liegen weitab von dem in der Diagonalen liegenden Hintergrund. Das entstehende Signalmuster kann dazu benutzt werden, den Liganden, in diesem Fall das in Fig. 1 gezeigte Disaccharid, weiter zu charakterisieren.

In Fig. 4 ist ein 2D-trNOESY-Spektrum des Rezeptor-Liganden-Komplexes aus Disaccharid 1 (Ligand) und Lectin AAA (Rezeptor) gezeigt. In Fig. 4 sind zwei typische Crosspeaks bezeichnet, die deutlich den trNOE zeigen. Der mit 1H -Fuc bezeichnete Crosspeak kann dem Proton am C_1 -Atom des Fucoserests zugeordnet werden.

Die mit 1H -GlcNAc bezeichneten Crosspeaks können dem Proton am C_1 -Atom des Glucosaminrests zugeordnet werden.

Vergleicht man Fig. 4 mit Fig. 3, so kann der Ligand, also das Disaccharid 1, in beiden Substanzbibliotheken A und B unmittelbar identifiziert werden. Die nicht an den Rezeptor bindenden Verbindungen haben dagegen schwach positive NOE-Signale, die im vorliegenden Spektrum nicht sichtbar sind.

In diesem Fall ist die Identifizierung des Liganden (Disaccharid 1) in den Substanzbibliotheken A und B durch Vergleich der in Fig. 3 und 4 gezeigten Spektren besonders leicht. Es wird deutlich, daß das in Fig. 1 gezeigte Disaccharid an das Lectin AAA bindet und daß weder die Bibliothek A noch B andere Verbindungen enthalten, die an das Lectin binden, denn sonst würden weitere trNOE-Peaks auftauchen.

Daraus ergibt sich, daß ein Ligand eindeutig in Substanzgemischen mit Hilfe eines extern zugegebenen Rezeptors mit dem erfindungsgemäßen Verfahren unmittelbar nachgewiesen werden kann.

Sind die Liganden und deren 1H NMR-Spektren nicht bekannt, so müssen weitere NMR-Experimente folgen, mit deren Hilfe die Substanzen identifiziert und deren Struktur aufgeklärt werden kann. Die am Ende des trNOE-Experiments erzeugte Magnetisierung, die nur für die gebundenen Verbindungen vorhanden ist, kann dazu benutzt werden, klassische 2D-NMR-Experimente (TOCSY, COSY, HMQC) anzuschließen. Diese Experimente können entweder als 3D-NMR-Experimente durchgeführt werden oder vorzugsweise als 1D- oder 2D-Varianten der 3D-Experimente.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis zumindest einer in einer Substanzbibliothek vorhandenen, als Ligand-Substanz unter Verwendung zumindest einer weiteren, an den Liganden bindenden als Rezeptor bezeichneten Substanz, gekennzeichnet durch

- a) Zugabe eines solchen Rezeptors zu der Substanzbibliothek, der ein wesentlich höheres Molekulargewicht als der nachzuweisende Ligand aufweist, und
- b) Durchführen eines solchen spektroskopischen Meßverfahrens mit der aus Schritt a) resultierenden Mischung, ohne Isolierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes, mit dem diejenigen dipolaren Resonanzphänomene erfaßbar sind, die bei einer Bindung des Rezeptors an den Liganden auftreten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als spektroskopisches Meßverfahren die NMR (Nuclear Magnetic Resonance)-Spektroskopie eingesetzt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als dipolares Resonanzphänomen der Transfer-Kern-Overhauser-Effekt (transfer Nuclear Overhauser Effect) trNOE gemessen wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als dipolares Resonanzphänomen der Transfer-Elektron-Kern-Overhauser-Effekt trNOE gemessen wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß der trNOE in einem zweidimensionalen NOE-Spektroskopie-Experiment 2D-NOESY oder 2D-ROESY gemessen wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der trNOE als Bestandteil eines mehrdimensionalen homo- oder heteronuklearen Experiments gemessen wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Evolutionszeiten bei der Messung konstant gehalten werden, um die Dimensionalität des Experiments zu erniedrigen.

8. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der trNOE in einem eindimensionalen Experiment gemessen wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Hochfrequenzpulse selektiv oder bereichsselektiv durchgeführt werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das 2D-NOESY-Spektrum der Substanzbibliothek in Gegenwart des Rezeptors mit einer kurzen Mischzeit, die insbesondere kleiner

als etwa 500 ms ist, durchgeführt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als spektroskopisches Meßverfahren die Fluoreszenz-Spektroskopie eingesetzt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als spektroskopisches Meßverfahren die ESR (Elektronenspinresonanz-Spektroskopie) eingesetzt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand eine niedermolekulare Substanz ist, deren Molekulargewicht kleiner als etwa 2000 DA ist.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor eine hochmolekulare Substanz ist, deren Molekulargewicht größer als etwa 15000 DA ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor aus mehreren hochmolekularen Substanzen besteht, deren Molekulargewicht jeweils größer als etwa 15000 DA ist.

16. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor eine Substanz ist, die in ein höhermolekulares Aggregat eingelagert ist, wobei das gesamte Molekulargewicht größer als ca. 15000 DA ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Rezeptor in ganzen Zellen oder in Zellfragmenten eingebettet ist.

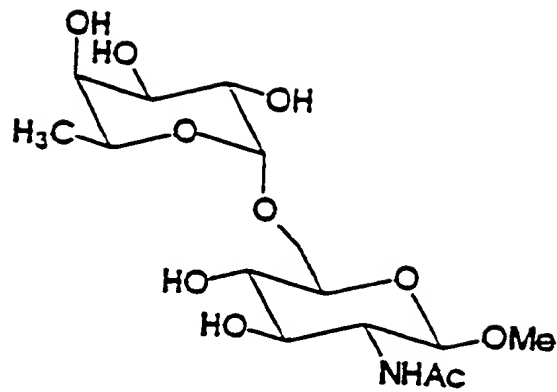
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzbibliothek natürliche Substanzen umfaßt, die insbesondere ausgewählt sind aus den Peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, Lipiden, ganzen Zellen, Organellen, Zellextrakten, ganzen Bakterien, Bakterienextrakten, ganzen Viren, Virenextrakten, Körperflüssigkeiten oder Mischungen davon.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzbibliothek synthetische Substanzen umfaßt.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß bei nicht bekannten Liganden weitere ein- oder mehrdimensionale NMR-Experimente zur Identifizierung des Liganden und/oder des Liganden-Rezeptor-Komplexes vor- oder nachgeschaltet werden.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß zur Auswertung komplexer Spektrendaten neuronale Netze eingesetzt werden.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen



Disaccharid **1**

Fig. 1

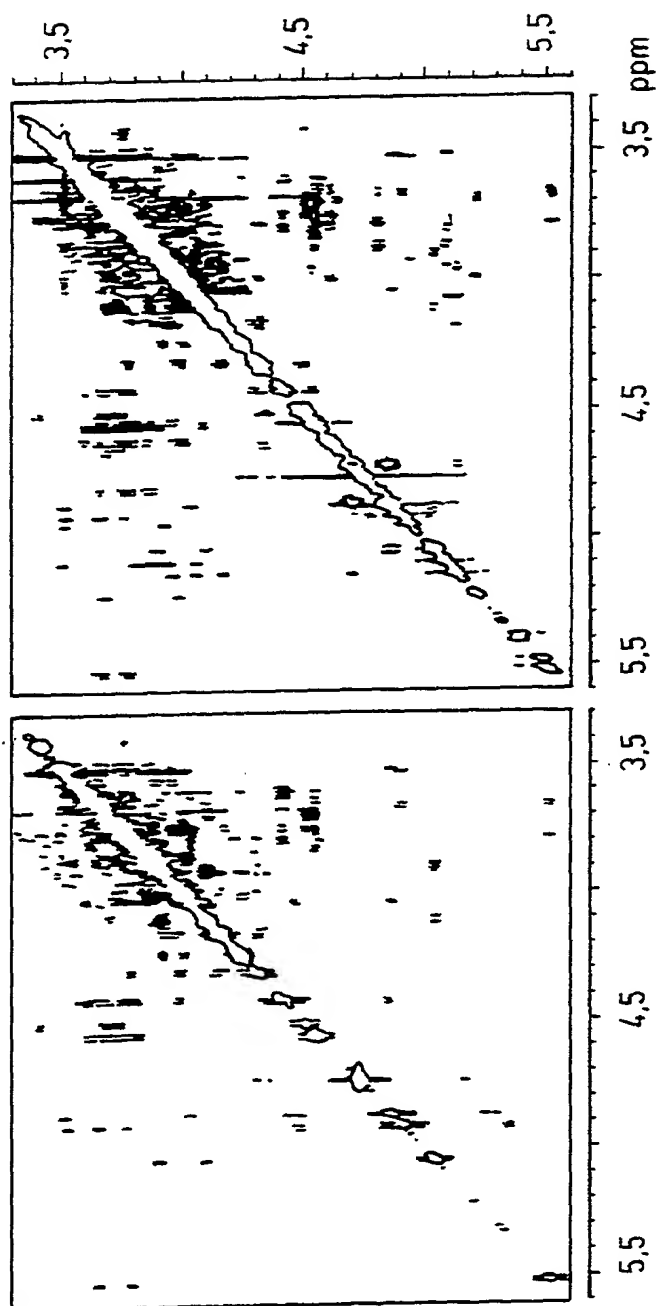


Fig. 2b

Fig. 2a

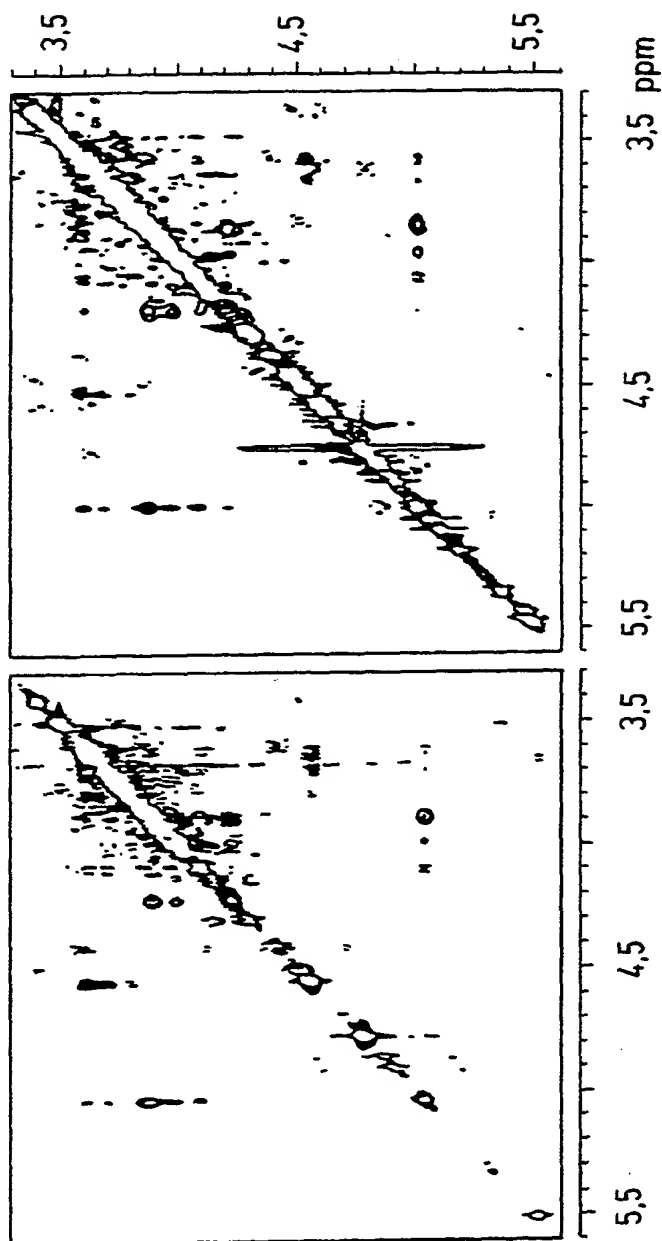


Fig. 3b

Fig. 3a

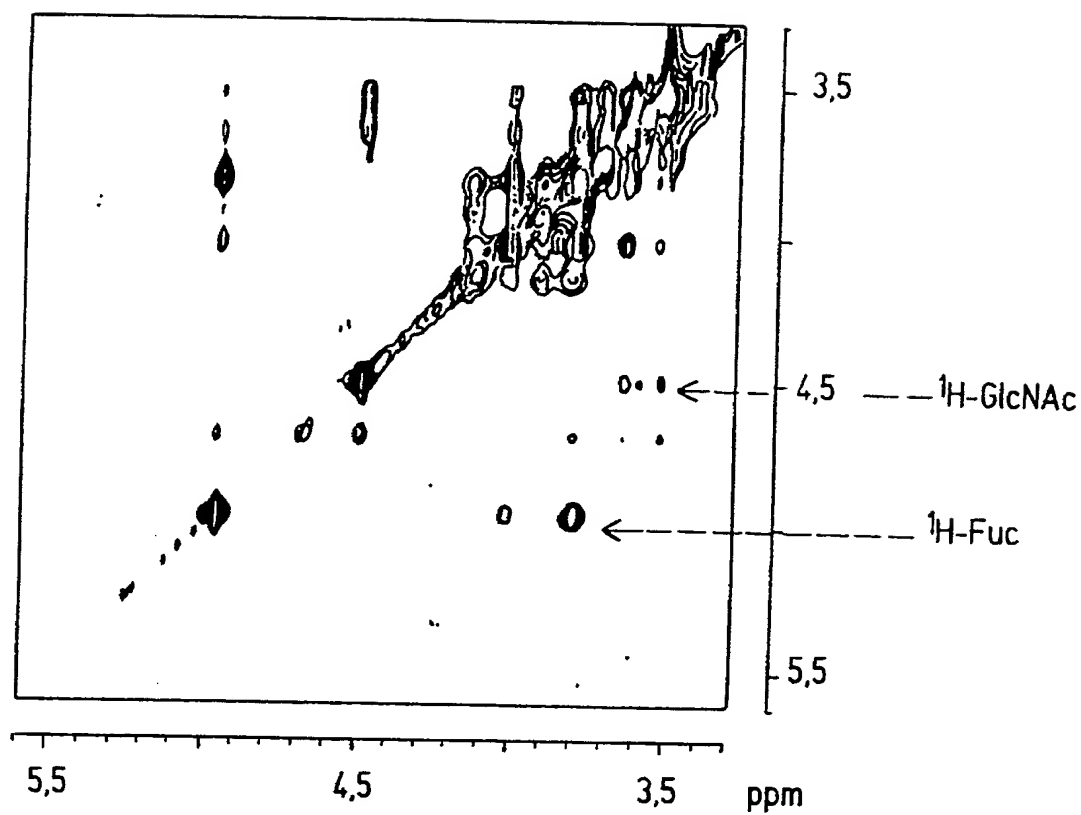


Fig. 4